

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001年5月10日 (10.05.2001)

PCT

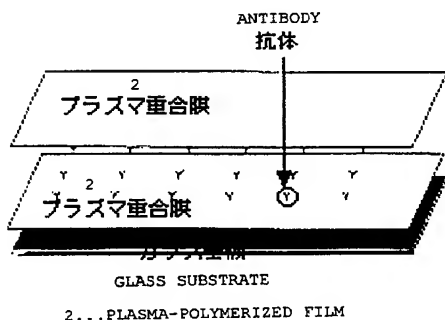
(10) 国際公開番号  
WO 01/33227 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 33/543, 33/547 (72) 発明者; および  
(21) 国際出願番号: PCT/JP00/07736 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 軽部征夫 (KARUBE, Isao) [JP/JP]; 〒216-0002 神奈川県川崎市宮前区東有馬一丁目3番16号 Kanagawa (JP). 池袋一典 (IKEBUKURO, Kazunori) [JP/JP]; 〒155-0033 東京都世田谷区代田3丁目27番29号309号室 Tokyo (JP). 矢野和義 (YANO, Kazuyoshi) [JP/JP]; 〒155-0031 東京都世田谷区北沢1-12-6 Tokyo (JP). 宮地寛登 (MIYACHI, Hirotaka) [JP/JP]; 〒208-0035 東京都武蔵村山市中原2-43-5 Tokyo (JP).  
(22) 国際出願日: 2000年11月2日 (02.11.2000)  
(25) 国際出願の言語: 日本語  
(26) 国際公開の言語: 日本語  
(30) 優先権データ: 特願平11/313633 1999年11月4日 (04.11.1999) JP  
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 先端科学技術インキュベーションセンター (CENTER FOR ADVANCED SCIENCE AND TECHNOLOGY INCUBATION, LTD.) [JP/JP]; 〒100-0005 東京都千代田区丸の内一丁目5番1号 新丸ノ内ビルディング6階 Tokyo (JP).  
(74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).  
(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR IMMOBILIZING MATERIAL

(54) 発明の名称: 物質固定化方法



(57) Abstract: A method for immobilizing a material comprising placing a material to be immobilized on the surface of a support and then forming a plasma-polymerized film; and an immobilized material which has been immobilized by using the method. Holding a material to be immobilized utilizing a plasma-polymerized film leads to a significant reduction in the damage to the material and also the liberation of the material from the support. Further, the immobilized material is present on the resultant surface of the support and maintains its bonding activity, which results in the application of the method, for example, to the indirect immobilization of biotinylated polynucleotide and to the detection of a ligand through immobilization of a protein capable of bonding such as an antibody.

(57) 要約:

支持体表面に固定化すべき物質を配置した後、プラズマ重合膜を形成することによって物質を固定化する方法、ならびにこの方法によって固定化された固定化物が提供された。プラズマ重合膜を利用して固定化物質を保持させることにより、固定化物質に対するダメージが小さく、固定化後の遊離も起きにくい。表面に物質の結合活性を維持しているため、更にビオチン化ポリヌクレオチドの間接的な固定などに応用できる。また、抗体などの結合性を有するタンパク質を固定化して、リガンドの検出に用いることができる。



IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,  
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT,  
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,  
UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 *PCT* ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

- 1 -

## 明細書

## 物質固定化方法

技術分野

本発明は、物質の固定化方法に関する。

背景技術

自然の状態では液体に溶解、あるいは分散して存在する物質を、人為的に適当な支持体に固定化することが広く行われている。たとえば、物質間の親和性を利用した分析方法では、結合した物質と結合しなかった物質とが、支持体を利用して分離される。その一例として、相補的な塩基配列で構成される核酸分子間の結合、すなわちハイブリダイゼーションを利用した分析方法では、分析対象である核酸分子が固相支持体に固定したプローブ核酸で捕捉される。捕捉された核酸分子は、固相支持体を液体と分離することにより容易に回収することができる。

同様の分離ステップは、抗原抗体反応を利用したイムノアッセイにおいても応用されている。例えば代表的なイムノアッセイである ELISA 法では、試料中に含まれる分析対象抗原を認識する抗体が固相支持体に固定されていて、固相上に捕捉した抗原が酵素標識抗体によって検出される。このとき、反応後の試料や、結合反応に与らなかった酵素標識抗体は、固相支持体と液相の分離によって簡単に取り除くことができる。

物質間の結合は、物質の精製においても利用されている。たとえば、結合反応を構成するパートナーのうちの一方の物質を固定化しておけば、そのパートナーを捕捉し、夾雑する他の成分を洗い流すことによって精製を行うことができる。たとえばプロテイン A を固定化した樹脂を充填したカラムに IgG を含む液体を流すと、IgG が吸着される。この状態で樹脂を洗浄すると、夾雑する成分はプロテ

- 2 -

インAと結合しないため洗い流されて IgG のみがカラム内に残される。続いてプロテインA-IgG 間の結合を解離させる特殊な条件を与えれば、精製 IgG を回収することができる。このような精製原理は、アフィニティクロマトグラフィーとして様々な物質の精製に広く利用されている。

物質の固定化方法は、化学的、あるいは生化学的な反応に基づく様々な物質の製造においても有用である。酵素や微生物は、幅広い物質の生産に利用されているが、基質や反応生成物を多く含む反応媒体から目的とする物質を分離回収するには多くの精製過程が要求される。そこで、酵素等の触媒成分を固相支持体などに固定化しておき、これを基質と接触させることによって必要な酵素反応を行わせる技術がもたらされた。高価な酵素を精製操作によって失うことになりかねないことから、経済性の点からも酵素の固定化と再利用は必要である。

酵素のような触媒成分の固定化は、バイオセンサの実用化によってますます重要性を増している。バイオセンサの機能は、さまざまな生体触媒成分や生化学的結合反応成分をセンサ表面に固定し、分析対象物質との相互作用をセンサで検知することによって実現されている。センサ表面に固定化された成分は、分析対象物質との反応に必要な活性を安定に保持していなければならない。またセンサ表面は、不必要なシグナルをセンサにもたらさないように、安定である必要がある。バイオセンサを繰り返し利用する場合や、常に分析対象と接触させる必要がある場合には、いったん固定化した物質の遊離が起きないことが求められる。このように、バイオセンサにおける物質の固定化には、多くの課題が要求されるのである。

さまざまな場面で広く応用されている物質の固定化方法には、大きく分けて、物理吸着、包括固定、そして化学的な結合反応による固定化などの方法が知られている。物理吸着としては、疎水性樹脂表面へのタンパク質の吸着があげられる。ELISA で用いる抗体固定化プレートは、通常この方法によって作成される。物理吸着は固定化のための操作がひじょうに簡単な反面、非特異吸着や、吸着した物

- 3 -

質の遊離が起きやすいという問題点がある。

包括固定は、ゲルやポリマー等の支持体に固定化すべき物質を包括させることによって固定化を達成する方法である。幅広い物質に応用できるが、支持体内部に活性物質が存在するために、反応性が低下したり、あるいは支持体内部に入りこんだ反応液の分離が不十分となる心配がある。また、単に包括されただけの状態にある物質は、物理吸着と同様に長期的には再び遊離してしまう可能性がある。

化学的な結合に基づく固定化方法においては、支持体表面に導入された官能基を、固定化すべき物質の官能基と化学的に結合させる方法が採られる。共有結合による強力な結合を達成できるので、遊離の可能性を小さくすることができる。しかし、化学的な反応を伴うことから、固定化すべき物質の構造変化を伴う恐れがあることや、固定化のための反応が比較的複雑であることは避けがたい問題点である。また、支持体表面に導入可能な官能基、あるいは固定化すべき物質における結合に利用可能な官能基がおのずと制限されることから、幅広い物質に応用することは難しい。

これらの各固定化方法に伴う様々な問題点を解決するために、多くの試みが報告されている。プラズマ重合膜の利用はその一つである。プラズマ重合膜は原料となるモノマーガスを選択することによって、表面に導入する官能基を多様なものとすることができる。したがって、プラズマ重合膜の登場によって化学的な結合に基づく固定化方法の可能性は大きく広がることになった。

たとえば、表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance、以下 SPR と省略する) バイオセンサ(特開平 9-264843)や、水晶振動子バイオセンサ(K.Nakanishi, et al. A novel method of immobilizing antibodies on a quartz crystal microbalance using plasma-polymerized films for immunosensors. Anal. Chem. 1996, 68:1695-1700) では、プラズマ重合膜によってセンサ表面にもたらされた官能基がタンパク質の固定化に利用されている。これらの先行技術では、プラズマ重合膜を利用してはいるものの、最終的な固定化方法は化学的な結合に依存して

- 4 -

いることから、固定化すべき物質のダメージといった問題点を解消することはできない。

この他、限外ろ過膜内部に酵素を保持させ、その表面をプラズマ重合膜でコートする方法が公知である（吉村菊子、他、「プラズマ重合法によるセンサー用酵素固定化膜の作成」,分析化学, 1990, 39:749-753）。この方法においては、ポーラスな支持体が必須であることから、固定化物質の最終的な形状が膜に限定されてしまう。また、膜の両面をコートしなければならない。更に膜の内部に固定化すべき物質が包括された形となることから、プラズマ重合膜の外表面では固定化物質との反応は期待できず、もっぱら支持体内部での反応が主になる。この他にもリパーゼの包括固定にプラズマ重合膜を利用した報告（特開平 6-153971）もあるが、物質が支持体内部に包括されてしまうことは共通である。したがって支持体内部の物質は、固定化物質表面における結合反応などに関与できない。

支持体上への固定化が望まれる化合物として、ポリヌクレオチドを挙げることもできる。たとえば遺伝子の解析ツールとして注目されている DNA マイクロアレイは、多種類のポリヌクレオチドを高密度に固定化したガラススライドで構成される。現在のところ、ポリヌクレオチドの固定化は、予め用意したポリヌクレオチドをガラススライド上にスポットして固着させる方法と、スライド上にヌクレオチドを 1 塩基ずつ合成していく方法が実用化されている。ポリヌクレオチドをスポットする方法では、ポリ-L-リジンのような塩基性のタンパク質でコートしたガラススライドの表面にポリヌクレオチドが吸着される現象を利用して、ポリヌクレオチドを固定化している。この固定化方法は、簡単に機械化できるので多量の DNA マイクロアレイを効率的に作成することができる。

しかしポリヌクレオチドの吸着によって得られた DNA マイクロアレイは、標識したポリヌクレオチドの非特異的な吸着を伴うことが多く、高感度化の障害になっている。また、吸着されたポリヌクレオチドは、洗浄などの操作に伴う流失を避けることができないことから、やはり感度の向上を阻む原因となる。支持体上

- 5 -

にオリゴヌクレオチドを化学的に合成する方法では、ポリヌクレオチドが共有結合によって固定化されているので、支持体からの遊離は起きにくい。しかし、多種類の塩基配列を固相上に合成するには、高度に制御された複雑な化学反応が要求される。

したがって、簡便な方法でポリヌクレオチドの固定化が可能で、しかも非特異的な吸着が起きにくく、そのうえいったん固定化したポリヌクレオチドが遊離しない DNA マイクロアレイが望まれている。

ポリヌクレオチドの他、抗体やタンパク質ライブラリーをはじめとするタンパク質も、支持体上への固定化が望まれる物質として挙げられる。ヒトゲノムの解読もほぼ終了し、次はゲノム情報にしたがって発現するタンパク質群、すなわちプロテオームの解析が最も重要になる。また、プロテオームの解析では個々のタンパク質がどのように発現し相互作用するかということが重要であるので、多数のタンパク質を一度に効率よく検出できるチップの開発が必要になる。

そのためには多種類のタンパク質を固定化したチップを利用することが有効であると考えられる。チップを開発する上で最も重要なのはタンパク質の固定化であり、現在までに吸着法や共有結合法など様々な手法が試みられてきたが、多種類のタンパク質を高い集積度で効率よく固定化することは非常に困難であった。

### 発明の開示

本発明は、固定化した物質が支持体から遊離しにくく、しかも固定化すべき物質に与えるダメージが小さい、物質の固定化方法の提供を課題としている。本発明はまた、簡便な操作で実施でき、幅広い物質の固定化に応用可能な物質の固定化方法の提供を課題とする。

たとえ自由に官能基を選択できるとしても、化学的な結合に頼る限り、固定化すべき物質へのダメージは避けられない。そこで本発明者は、プラズマ重合膜の利用を考えた。プラズマ重合膜は、低温で低真空という穏やかな環境で、均一性

- 6 -

の高い薄膜を自由な形状に形成することができる。そして、固定化すべき物質を支持体表面上に配置した後にプラズマ重合膜を形成することによって、物質を支持体表面に保持させることができ、しかもプラズマ重合膜表面において保持した物質の活性が維持されていることを見出し本発明を完成した。本発明者により、ガスとして供給されたモノマー原料はプラズマエネルギーによって活性種となるが、支持体表面に配置された固定化すべき物質はほとんど影響を受けないことが明らかとなった。すなわち本発明は、以下の物質固定化方法、この方法によって得ることができる固定化物質、ならびにその用途に関する。

〔１〕 次の工程を含む支持体表面に物質を固定化する方法。

    a) 支持体表面に固定化すべき第１の物質を配置する工程

    b) 工程 a) の後に支持体表面にプラズマ重合膜を形成する工程

〔２〕 第１の物質がタンパク質である〔１〕に記載の方法。

〔３〕 タンパク質が結合活性を持つものである〔２〕に記載の方法。

〔４〕 タンパク質が、アビジン、ストレプトアビジン、レクチン、プロテイン A、プロテイン G、抗体、レセプター、および DNA 結合性タンパク質、またはそれらの誘導体からなる群から選択されたいずれかのタンパク質である〔３〕に記載の方法。

〔５〕 結合活性を有するタンパク質が抗体、またはその抗原結合ドメインを含む断片である〔４〕に記載の方法。

〔６〕 プラズマ重合膜の膜厚が 30 ～ 120 Å である〔５〕に記載の方法。

〔７〕 工程 b) の後に、結合活性を持つタンパク質に、そのリガンドで修飾した第２の物質を結合させる工程 c) を含む〔３〕に記載の方法。

〔８〕 第２の物質が、タンパク質、糖、ポリヌクレオチド、ホルモン、および生理活性物質からなる群から選択されるいずれかの物質である〔７〕に記載の方法。

〔９〕 第２の物質がポリヌクレオチドである〔８〕に記載の方法。



- 7 -

- 〔10〕 第1の物質がアビジンおよび／またはストレプトアビジンであり、かつ第2の物質を修飾するリガンドがビオチンである〔9〕に記載の方法。
- 〔11〕 異なる塩基配列を持つポリヌクレオチドを支持体上の定められた区画ごとに結合させる〔9〕に記載の方法。
- 〔12〕 プラズマ重合膜が疎水性表面を持つものである〔9〕に記載の方法。
- 〔13〕 工程a)における支持体表面に予めプラズマ重合膜が形成されている〔1〕に記載の方法。
- 〔14〕 予め形成されたプラズマ重合膜が疎水性表面を有している〔13〕に記載の方法。
- 〔15〕 タンパク質が酵素活性を持つものである〔2〕に記載の方法。
- 〔16〕 〔1〕の方法によって得られる固定化物質。
- 〔17〕 〔5〕の方法によって得られる固定化物質。
- 〔18〕 〔9〕の方法によって得られる固定化物質。
- 〔19〕 以下の要素で構成される固定化物質。  
a) 支持体表面に配置された第1の物質、  
b) 第1の物質を保持するプラズマ重合膜
- 〔20〕 第1の物質がタンパク質である〔19〕に記載の固定化物質。
- 〔21〕 タンパク質が結合活性を持つものである〔20〕に記載の固定化物質。
- 〔22〕 タンパク質が、アビジン、ストレプトアビジン、レクチン、プロテインA、プロテインG、およびDNA結合性タンパク質、またはそれらの誘導体からなる群から選択されたいずれか1つのタンパク質である〔21〕に記載の固定化物質。
- 〔23〕 タンパク質が抗体である〔22〕に記載の固定化物質。
- 〔24〕 プラズマ重合膜の膜厚が30－120 Åである〔23〕に記載の

- 8 -

固定化物質。

〔25〕 結合活性を持つタンパク質に、そのリガンドで修飾した第2の物質が結合されている〔21〕に記載の固定化物質。

〔26〕 タンパク質が酵素活性を持つものである〔20〕に記載の固定化物質。

〔27〕 以下の要素で構成される固定化ポリヌクレオチド。

- a) 支持体表面に配置された結合性のタンパク質
- b) 結合性のタンパク質を保持するプラズマ重合膜
- c) 結合性のタンパク質のリガンドを介して支持体表面に固定化されたポリヌクレオチド

〔28〕 異なる塩基配列を持つポリヌクレオチドが支持体上の定められた区画ごとに結合された〔27〕に記載の固定化ポリヌクレオチド。

〔29〕 支持体表面に結合性のタンパク質をプラズマ重合膜で保持させたポリヌクレオチド固定化用担体。

〔30〕 〔29〕に記載の担体と、結合性のタンパク質に対するリガンドで修飾したプライマーとを含む、ポリヌクレオチド固定化用キット。

〔31〕 次の工程を含む核酸ハイブリダイゼーションアッセイ法。

- a) 〔18〕に記載の固定化物質、または〔27〕に記載の固定化ポリヌクレオチドに検出すべき核酸を含む試料を接触させる工程
- b) プローブと試料中の核酸とのハイブリダイゼーションを検出する工程

〔32〕 次の工程を含むリガンドの検出方法。

- a) 〔17〕、または〔23〕に記載の固定化物質に、検出すべきリガンドを含む試料を接触させる工程
- b) 抗体またはその抗原結合ドメインを含む断片と試料中のリガンドとの結合を検出する工程

あるいは本発明は、支持体表面にプラズマ重合膜によって結合活性を有するタ

ンパク質を保持させた担体の、ポリヌクレオチドの固定化方法における使用に関する。更に本発明は、支持体表面にプラズマ重合膜によって結合活性を有するタンパク質を保持させた担体の、リガンドの検出における使用に関する。

本発明の固定化方法においては、まず支持体表面に固定化すべき第 1 の物質が配置される。物質を配置するとは、文字どおり、物質が支持体表面になんらかの形で置かれることを意味する。したがって、両者の間には、特に強固な吸着であるとか、化学的な結合は必ずしも求められない。具体的には、固定化すべき第 1 の物質を適当な溶媒に溶解（あるいは分散）させ、これを支持体に塗布したり、あるいは支持体を溶液中に浸漬後に乾燥させることによって、この物質を配置することができる。このとき用いる溶媒は、プラズマ重合に先だって十分に乾燥させておくのが望ましい。支持体表面に溶媒が残っていると、均一なプラズマ重合膜の成長を妨げる可能性がある。この他、固体物質を加温融解して塗布や噴霧によって配置することもできる。

本発明によって固定化すべき第 1 の物質は、プラズマ重合反応の場において気化しない物質であればどのような化合物であってもよい。具体的には、タンパク質、糖、核酸等の幅広い物質を、本発明によって固定化することができる。本発明による固定化すべき第 1 の物質として特に有利なのは、プラズマ重合膜表面においてその物質の活性の発現が期待される物質である。このような活性としては、たとえば結合活性や酵素活性を示すことができる。

結合活性を持つ物質を第 1 の物質として固定化した場合には、更に第 1 の物質のリガンドを結合させることができる。リガンドとの結合活性は、リガンドの検出や精製に利用できるのみならず、リガンドで修飾した物質（第 2 の物質）の固定化に利用することができる。リガンドとの結合の利用については、以下に更に具体的に述べる。

一方、酵素活性を持つ物質を第 1 の物質として固定化したときには、固定化酵素としてバイオリアクターの触媒として、あるいは酵素バイオセンサーとして利

- 10 -

用することができる。本発明において、固定化される酵素活性物質は、1種類のみならず複数の酵素の混合物であることもできる。

本発明では、結合が観察される物質の組み合わせを、結合パートナーと記載することがある。結合するためには、結合パートナーが接近することが重要な条件である。プラズマ重合膜の表面で固定化すべき物質の活性が維持される本発明では、その表面で結合活性が維持されることになる。つまり物質間の接近にとって非常に有利な状態を達成することができるのである。たとえば、以下のような物質の組み合わせにおいて、結合が観察されることが公知である。

アビジン（あるいはストレプトアビジン）－ビオチン、

糖－レクチン、

ヒスチジンタグ－金属イオン、

プロテインA（あるいはプロテインG）－IgG、

抗体－抗原、

ホルモン－ホルモン受容体、

DNA 結合性タンパク質－DNA

固定化すべき第1の物質として結合パートナーを用いるとき、固定化される側の化合物は特に制限されない。すなわち、結合パートナーのいずれの側をも第1の物質として固定化することができる。しかしながら、小さな分子はプラズマ重合膜に覆われてしまい、その表面での結合活性を維持しにくい場合もあることから、タンパク質のような比較的大きな分子を固定化物質とするのが有利である。ただし本発明は、小さな分子の固定化を排除するものではない。小さな分子であっても、分子が完全に包括されることのない薄いプラズマ重合膜を形成すれば、その表面に固定化物質の活性を維持することは可能である。当業者は、本発明の開示に基づいて、膜表面に固定化すべき物質の活性を維持させることができるようにプラズマ重合の条件を調整することができる。

本発明においては、上記のような理由から固定化すべき第1の物質としてはた

- 1 1 -

たとえば結合性のタンパク質が好ましい。アビジン（あるいはストレプトアビジン）は、ビオチンとの強固な結合を形成するタンパク質である。レクチンは糖結合性のタンパク質の総称で、糖、あるいは糖鎖を結合する。プロテインAやプロテインGは、IgGの定常領域を結合するタンパク質として知られている。ホルモナーホルモン受容体については、既に多くの組み合わせについて、構造が明らかにされている。ホルモン受容体は、本発明における望ましい結合性タンパク質を構成する。またDNA結合タンパク質とは、MutSやMutMのような、2本鎖DNAのミスマッチを認識して結合する遺伝子の修復システムに関連したタンパク質が公知である。その他、遺伝子の転写制御などに関与している転写因子も、DNAの塩基配列を認識して結合するタンパク質の一つである。これらの結合活性を持つタンパク質は、その誘導体を固定化すべき第1の物質として利用することもできる。本発明において誘導体とは、活性を維持しつつその構造を改変された分子を意味する。具体的には、たとえば結合活性の発現に必要な結合ドメインのみからなる断片、あるいはこの断片と他のタンパク質との融合タンパク質等が誘導体として挙げられる。

これらの固定化すべき物質を配置する支持体は、表面に固定化すべき物質を配置することができるものであれば、任意の素材を利用することができる。したがって最終的な固定化物質の用途に応じた素材を選択すれば良い。通常は、極薄膜となるプラズマ重合膜を支持するために一定の強度を持ち、表面に固定化すべき物質を配置するために非浸透性の素材が用いられる。

本発明に利用可能な溶媒非浸透性の支持体として、具体的には、ガラス、金属、シリコン、あるいはプラスチックなどの素材を示すことができる。しかし、固定化すべき物質は透過できないが溶媒の透過は許すようなポーラスな素材であっても本発明に利用することは可能である。更に、最終的に形成するプラズマ重合膜表面に固定化物質の活性を維持できるのであれば、フィルターのような多孔性支持体を利用することもできる。本発明においては、支持体表面を予めプラズマ重

- 12 -

合膜でコートしておくこともできる。本発明者らの得た知見によれば、予めプラズマ重合膜をコートした後に固定化物質の配置と最終的なプラズマ重合膜の形成を行うことによって、より活性の高い固定化物質とすることができる。予め形成するプラズマ重合膜は、固定化すべき物質を吸着しやすい素材とすることもできる。固定化すべき物質を配置する前に予めプラズマ重合膜をコートする場合には、支持体の素材に関わらず、その表面を溶媒非浸透性の状態にすることができる。

支持体の形状も、用途に合わせて自由に選択することができる。プラズマ重合膜は複雑な形状をした表面であっても均一な薄膜を施すことができる。したがって、支持体の形状は任意であってよい。たとえば、容器内壁に物質の固定化を行うことができる。また、微粒子や肉眼的な大きさの球状の担体の表面に物質を固定することもできる。このような立体的な支持体は、カラムなどに充填して用いるときに有利な形状である。DNA アレイの支持体とする場合には、一般的なガラススライドを用いれば良い。

プラズマ重合は、真空中でモノマーガスをプラズマ励起によって直接支持体表面に成膜を行う技術である。図1に実施例に用いたプラズマ重合装置の構造を示す。モノマーガスの成分を換えることによって、さまざまな特徴を持つプラズマ重合膜を得ることができる。プラズマ重合では原理的にはどのようなモノマーを用いても、重合が可能である。通常のポリマーを得るためには二重結合の開裂が必要となるのに対して、プラズマ中ではモノマーガスがばらばらになり多くの活性種を介した重合反応が起きるためである。プラズマエネルギーによって重合を行うことから、反応の場に置かれたタンパク質への影響を小さくすることができる。そのため、タンパク質の活性が高い水準で維持される。

本発明におけるプラズマ重合膜のためのモノマーガスは、支持体表面に固定化すべき物質を保持することができる重合膜を与えるものであればよい。なお本発明において、支持体表面での物質の保持とは、プラズマ重合膜の構造の中に固定化すべき物質が捕捉されている状態を意味する。そのため、固定化された第1の

## - 13 -

物質は支持体表面においてプラズマ重合膜に封じ込められることになる。その結果、固定化された第1の物質の遊離は効果的に抑止される。

同時に本発明においては、固定化すべき物質の少なくとも一部は、その活性部位がプラズマ重合膜の外側表面でその活性を発現できる状態となっている。したがって、プラズマ重合膜の表面にある官能基に固定化すべき物質を化学的に結合させた固定化物質とは明瞭に区別される。また、ポーラスな素材の中に固定化すべき物質を浸透させて、その表面をプラズマ重合膜でコートした公知の固定化物質とも明確に異なった構造である。

このような条件を満足するプラズマ重合膜を与えるモノマーガスとしては、以下のようなものを示すことができる（「プラズマ重合」長田義人・編、角田光雄、中島薫、宮村雅隆、森田慎三、他著、東京化学同人 1986 年発行）。

アルカン、またはシクロアルカンとして、次の化合物を示すことができる。

メタン、エタン、プロパン、ブタン、イソブタン、ペンタン、イソペンタン、ネオペンタン、ヘキサン、イソヘキサン、3-メチルペンタン、2,2-ジメチルブタン、2,3-ジメチルブタン、ヘプタン、2,2,3-トリメチルブタン、オクタン、ノナン、デカン、メタン-d<sub>1</sub>、メタン-d<sub>2</sub>、メタン-d<sub>3</sub>、メタン-d<sub>4</sub>、シクロプロパン、シクロブタン、シクロペンタン、シクロヘキサン、メチルシクロヘキサン、シクロオクタン、cis-デカリン、および trans-デカリン。

アルケン、アルキン、あるいはシクロアルケンとしては、次の化合物を示すことができる。

エチレン、プロピレン、1-ブテン、(Z)-2-ブテン、(E)-2-ブテン、2-メチルプロペン、1-ペンテン、2-メチル-1-ブテン、3-メチル-1-ブテン、2-メチル-2-ブテン、1-ヘキセン、(E)-2-ヘキセン、(E)-3-ヘキセン、3-メチル-1-ペンテン、2,3-ジメチル-2-ブテン、1-ヘプテン、1-オクテン、(E)-2-オクテン、1-デセン、1,3-ブタジエン、(Z)-1,3-ペンタジエン、(E)-1,3-ペンタジエン、イソプレン、2,3-ジメチル-1,3-ブタジエ

- 14 -

ン、アセチレン、プロピン、1-ブチン、2-ブチン、1-ペンチン、3-メチル-1-ブチン、ビニルアセチレン、シクロプロペン、シクロブテン、シクロペンテン、シクロヘキセン、シクロヘプテン、シクロペンタジエン、1,3-シクロヘプタジエン、およびシクロオクタテトラエン。

アルコール、アルデヒド、ケトン、カルボン酸、あるいはエステルとしては次の化合物を示すことができる。

メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、2-メチル-1-プロパノール、2-メチル-2-プロパノール、アリルアルコール、1,3-ブタンジオール、2,3-ブタンジオール、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、プロピオンアルデヒド、ブチルアルデヒド、バレルアルデヒド、イソバレルアルデヒド、アクリルアルデヒド、クロトンアルデヒド、グリオキサール、アセトン、2-ブタノン、2-ペンタノン、3-メチル-2-ブタノン、3-ペンタノン、2-ヘキサノン、4-メチル-2-ペンタノン、2-ヘプタノン、シクロブタノン、シクロペンタノン、シクロヘキサノン、シクロヘプタノン、シクロオクタノン、4-メチル-3-ペンテン-2-オン、2,3-ブタンジオン、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、イソ酪酸、アクリル酸、ギ酸メチル、ギ酸エチル、ギ酸プロピル、ギ酸ブチル、ギ酸イソブチル、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸プロピル、酢酸イソプロピル、酢酸ブチル、酢酸イソブチル、酢酸 s-ブチル、プロピオン酸メチル、酪酸メチル、酢酸ビニル、および酢酸アリル。

エーテル、アミン、あるいはその他のモノマーガスとして利用可能な化合物を以下に示す。

ジメチルエーテル、ジエチルエーテル、ジプロピルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ジブチルエーテル、エチレンオキシド、1,3-ジオキソラン、1,3-ジオキサン、1,4-ジオキサン、メチルビニルエーテル、メチルアミン、エチルアミン、プロピルアミン、イソプロピルアミン、ブチルアミン、イソブチルアミン、s-ブチルアミン、t-ブチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、ジ



- 15 -

エチルアミン、トリエチルアミン、ジプロピルアミン、ジイソプロピルアミン、トリプロピルアミン、ジブチルアミン、アリルアミン、ホルムアミド、アセトアミド、N-メチルアセトアミド、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、メタンチオール、エタンチオール、硫化ジメチル、硫化ジエチル、硫化ジプロピル、二硫化ジメチル、二硫化ジエチル、メタンジチオール、1,2-エタンジチオール、ニトロメタン、ニトロエタン、1-ニトロプロパン、2-ニトロプロパン、1-ニトロブタン、2-ニトロブタン、アセトニトリル、プロピオニトリル、およびアクリロニトリル。

また、次のようなハロゲン化物をモノマーガスに利用することができる。

フルオロメタン、ジフルオロメタン、フルオロホルム、テトラフルオロメタン（四フッ化炭素）、フッ化ビニル、1,1-ジフルオロエチレン、(Z)-1,2-ジフルオロエチレン、(E)-1,2-ジフルオロエチレン、トリフルオロエチレン、テトラフルオロエチレン、1,1,4,4-テトラフルオロブタジエン、ペルフルオロブタジエン、2-フルオロエタノール、トリフルオロ酢酸、1,1,1-トリフルオロ-2-プロパノン、ペルフルオロアセトン、クロロメタン、ジクロロメタン、クロロホルム、テトラクロロメタン（四塩化炭素）、クロロエタン、1,1-ジクロロエタン、1,2-ジクロロエタン、1-クロロプロパン、2-クロロプロパン、1,2-ジクロロプロパン、1,3-ジクロロプロパン、1-クロロブタン、2-クロロブタン、1-クロロ-2-メチルプロパン、2-クロロ-2-メチルプロパン、クロロシクロプロパン、1,1-ジクロロシクロプロパン、塩化ビニル、1,1-ジクロロエチレン、(Z)-1,2-ジクロロエチレン、(E)-1,2-ジクロロエチレン、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレン、3-クロロプロペン、1,3-ジクロロプロペン、クロロアセチレン、ジクロロアセチレン、1-クロロプロピン、2-クロロエタノール、クロロアセトアルデヒド、クロロアセトニトリル、ジクロロアセトニトリル、トリクロロアセトニトリル、ブロモメタン、ジブロモメタン、ブロモホルム、テトラブロモメタン（四臭化炭素）、ブロモエタン、1,1-ジブロモエタン、1,2-

- 16 -

ージブromoエタン、1ーブromoプロパン、2ーブromoプロパン、1,3ージブromoプロパン、1ーブromoブタン、2ーブromoブタン、1ーブromoー2ーメチルプロパン、2ーブromoー2ーメチルプロパン、1,4ージブromoブタン、1ーブromoビシクロ[2.2.1]ヘブタン、1ーブromoビシクロ [2.2.2] オクタン、臭化ビニル、3ーブromoプロペン、1,3ージブromoプロペン、ブromoアセチレン、ジブromoアセチレン、1ーブromoプロピン、2ーブromoエタノール、ヨードメタン、ジヨードメタン、ヨードホルム、テトラヨードメタン (四ヨウ化炭素)、ヨードエタン、1ーヨードプロパン、2ーヨードプロパン、1ーヨードブタン、2ーヨードブタン、1ーヨードー2ーメチルプロパン、2ーヨードー2ーメチルプロパン、1ーヨードペンタン、3ーヨードプロペン、ヨードアセチレン、ジヨードアセチレン、2ーヨードエタノール、1ーブromoー2ークロロエタン、1,1,1ートリフルオロー2ーヨードエタン、2ークロロー1,1ージフルオロエチレン、1ークロロー1,2,2ートリフルオロエチレン、1,1ージクロロー2,2ージフルオロエチレン、1ーブromoー2ークロロアセチレン、1ークロロー2ーヨードアセチレン、および1ーブromoー2ーヨードアセチレン。

更に、以下のような芳香族炭化水素がモノマーガスとして利用できる。

ベンゼン、トルエン、エチルベンゼン、プロピルベンゼン、クメン、ブチルベンゼン、sーブチルベンゼン、tーブチルベンゼン、oーキシレン、mーキシレン、pーキシレン、oージエチルベンゼン、mージエチルベンゼン、pージエチルベンゼン、メシチレン、1,2,4,5ーテトラメチルベンゼン、スチレン、フェニルアセチレン、(E)ー1ープロベニルベンゼン、(E)ー1ーフェニルブタジエン、2ーフェニルブタジエン、ビフェニル、ナフタレン、1ーメチルナフタレン、2ーメチルナフタレン、アントラセン、フェナントレン、ピレン、ナフタセン、クリセン、およびベンタセン。

加えて、次のベンゼン誘導体等も本発明のモノマーガスに有用である。

フェノール、ベンズアンデヒド、アセトフェノン、アニソール、ベンジルメチルエーテル、アニリン、ベンジルアミン、チオフェノール、ベンゾニトリル、フ

- 17 -

ルオロベンゼン、クロロベンゼン、ブロモベンゼン、ヨードベンゼン、o-ジクロロベンゼン、m-ジクロロベンゼン、p-ジクロロベンゼン、o-ジブロモベンゼン、m-ジブロモベンゼン、p-ジブロモベンゼン、トリフルオロベンゼン、ヘキサフルオロベンゼン、o-フルオロトルエン、m-フルオロトルエン、p-フルオロトルエン、o-クロロトルエン、p-クロロトルエン、o-ブロモトルエン、p-ブロモトルエン、o-ヨードトルエン、m-ヨードトルエン、p-ヨードトルエン、p-クロロフルオロベンゼン、および o-クロロヨードベンゼン。

また、次のような複素環式化合物がモノマーガスとして利用できる。

ビリジン、2-メチルビリジン、3-メチルビリジン、4-メチルビリジン、2,6-ジメチルビリジン、2,5-ジメチルビリジン、2,4-ジメチルビリジン、ピリダジン、ピリミジン、ピラジン、1,3,5-トリアジン、ビリジンN-オキシド、2-メチルビリジンN-オキシド、3-メチルビリジンN-オキシド、4-メチルビリジンN-オキシド、2,6-ジメチルビリジンN-オキシド、フラン、メチルフラン、テトラヒドロフラン、ピロール、ピロリジン、チオフェン、および 2-クロロチオフェン。

その他、トロポンやトロボロンのようなトロポノイド化合物、またテトラメチルシラン、テトラメチルスズ、テトラメチル鉛に代表される有機金属化合物をモノマーガスに用いることもできる。

これらのモノマーガスによってプラズマ重合膜を成膜する条件は公知である。具体的には、プラズマ重合反応の再現性に影響を与える主な要因として、たとえば流速、放電電力、放電時間、そして圧力といった条件が重要であるとされている。プラズマ重合においては、装置やモノマーに合わせて最適な重合条件を設定する必要がある。W/FM (ここで W は放電電力、F は流速、M はモノマーの分子量) が同じであれば、膜質はほぼ同じであるとする報告 (Yasuda, Plasma Polymerization, Academic Press, New York, 1985) がある。

利用するモノマーガスや、最終的に必要なプラズマ重合膜の膜厚等を考慮して、

- 18 -

これらの条件を適切に調整することは当業者が日常的に行っていることである。また文献的にも各種のパラメーターがプラズマ重合膜の性質に及ぼす影響は明らかにされている (Surface and Coatings Technology 82:1-15, 1996, Polymer Engineering and Science 37/7:1188-1194, 1997)。後にポリヌクレオチドの固定化を目的とする場合に有利なモノマーガスとして説明するヘキサメチルジシロキサンでプラズマ重合膜を作成するには、たとえば次のような範囲のもとで最適な条件を選択することにより、およそ  $0 \sim 240 \text{ \AA}$  のプラズマ重合膜を形成することができる。

流速 :  $0 \sim 50 \text{ cm}^3/\text{min}$ .

放電電力 :  $0 \sim 300 \text{ W}$

圧力 :  $10^{-6} \sim 10 \text{ Torr}$

放電時間  $0 \sim 5 \text{ 分}$

(温度 :  $0 \sim 100^\circ \text{C}$ )

あるいは、 $0 \sim 240 \text{ \AA}$  のプラズマ重合膜を形成するための、より望ましい条件として、次の条件を示すことができる。

流速 :  $10 \sim 50 \text{ cm}^3/\text{min}$ .

放電電力 :  $20 \sim 100 \text{ W}$

圧力 :  $0.05 \sim 0.6 \text{ Torr}$

放電時間  $30 \text{ 秒} \sim 5 \text{ 分}$

(温度 : 室温)

本発明によって得られた固定化物質が結合活性を持つ物質であるとき、この固定化物質には更にその結合パートナーであるリガンドを結合することができる。リガンドの結合は、固定化物質がプラズマ重合膜の表面において活性を維持しているという本発明の特徴によって可能となる。このとき、結合パートナーで修飾された第2の物質を与えることによって、任意の第2の物質の固定化が可能となる。リガンドを介して固定化された第2の物質は、その分子全体がプラズマ重合

- 19 -

膜の表面に完全に露出した状態で存在することから、液相中に存在する物質との接触には有利となる。その結果、たとえば支持体中に固定化すべき物質が埋もれてしまう包括固定等の公知の方法に比べると、本発明では様々な液相系の反応において高い反応性を期待することができる。

以下に結合パートナーを利用した本発明に基づく第2の物質の固定化について、具体的に述べる。本発明による物質の固定化方法として有用な組み合わせの一つに、結合パートナーとしてのストレプトアビジン-ビオチンを利用した、ポリヌクレオチド（第2の物質）の固定化方法を示すことができる。すなわち、たとえばガラススライドのような支持体にストレプトアビジン（第1の物質）を配置し、これをプラズマ重合膜の形成により固定化する。ストレプトアビジンは、水溶液として塗布した後に真空、あるいは自然乾燥することによって配置される。このとき用いるガラススライドは、予めプラズマ重合膜によって下塗りされているものを用いることができる。プラズマ重合膜の下塗りによって、ストレプトアビジンのより確実な固定化を期待できる。

ストレプトアビジンを配置したスライドガラスの表面には、プラズマ重合膜を形成する。このとき形成されるプラズマ重合膜を、 $0 \sim 240 \text{ \AA}$ 、望ましくは $5 \sim 150 \text{ \AA}$ 、より望ましくは $30 \sim 45 \text{ \AA}$ の膜厚とすることにより、ストレプトアビジンのビオチンに対する結合活性を膜表面に維持することができる。その結果、膜表面ではストレプトアビジンの結合活性によってビオチンが捕捉される。プラズマ重合膜の厚さは、重合時間によって制御される。当業者は、本発明に基づいて、適切な膜厚を得るために、固定化すべき第1の物質とプラズマ重合膜の組み合わせに応じて重合条件を調整することができる。

ストレプトアビジンを固定化したガラススライドには、ビオチンで修飾した第2の物質を結合させることができる。第2の物質としては、たとえばポリヌクレオチドを用いることができる。ポリヌクレオチドは、ヌクレオチドが多数重合した分子である。本発明においては、ポリヌクレオチドを構成するヌクレオチドの

- 20 -

数は特に制限されない。ポリヌクレオチドが数十以下の少数のヌクレオチドで構成される場合には、特にオリゴヌクレオチドとも表現する。一方数百を超えるデオキシリボヌクレオチドからなるポリヌクレオチドは、DNA とも表現する。本発明のポリヌクレオチド、またはオリゴヌクレオチドは、天然のものであることもできるし、化学的に合成されたものであることもできる。本発明におけるポリヌクレオチドは、DNA、あるいは RNA を含む。本発明のポリヌクレオチドは、鋳型となる DNA をもとに PCR のような酵素的な反応によって合成されたものであっても良い。ポリヌクレオチドをビオチンで修飾する方法は公知である。たとえば、ポリヌクレオチドを合成するときにビオチン化ヌクレオチドを組み合わせることによって、任意の位置にビオチンを結合したポリヌクレオチドを合成することができる。更にビオチンを結合したオリゴヌクレオチドをプライマーとして PCR を行えば、ビオチン修飾 DNA を増幅生成物として多量に得ることができる。ビオチン修飾 DNA は、本発明によるストレプトアビジン固定化ガラススライドとの接触によって、その表面に容易に固定化することができる。

このようにして得られた本発明による固定化ポリヌクレオチドは、ハイブリダイゼーションアッセイ用の固定化プローブとして有用である。特にプラズマ重合膜として疎水性の強い素材を利用すれば、ハイブリダイゼーション用の固相として特に有利である。具体的には、第 1 に疎水性であることから、ポリヌクレオチドの非特異的な吸着がほとんど起こらない。一般にハイブリダイゼーションアッセイにおいては、ハイブリダイゼーションによって固相に捕捉された標識プローブのシグナルに基づいて分析が行われる。ポリヌクレオチドの非特異的な吸着は、ハイブリダイゼーションに基づかないシグナルをもたらすことから、バックグラウンドの上昇を通じて結果的に感度の低下の原因となる。疎水性のプラズマ重合膜表面では、ハイブリダイゼーションに基づかない非特異的なポリヌクレオチドの吸着がほとんど起こらないことから、バックグラウンドシグナルを低いレベルに抑え、結果として高い感度を達成することができる。

- 21 -

また第2に、固定化されているポリヌクレオチドそのものが、プラズマ重合膜表面から離れ易くなることから、液相中に存在する相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションの機会が増えるという利点が考えられる。一方、公知のポリヌクレオチドの固定化用支持体においては、固定化されたポリヌクレオチドの多くが支持体表面に貼りついたような状態となっていることが想定され、このような状態では液相中に存在するポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションの機会が制限されてしまう恐れがある。このような特徴も本発明の固定化方法をポリヌクレオチドの固定化に応用した場合の大きな利点である。

前記モノマーガスの中で、疎水性のプラズマ重合膜を与えるものとしては、ヘキサメチルジシロキサン (hexamethyldisiloxane、以下 HMDS と省略する)、テトラメチルジシロキサン等のシリコンを含んだオルガノシリコン、アルカン、アルキン、アルケン、ベンゼンやキシレンのような炭化水素系モノマーを用いることができる。プラズマ重合膜の親水性は、素材となるモノマーガスだけでなく重合条件の影響も受ける。しかし HMDS は、幅広い条件において疎水性の膜を与えることができるモノマーガスの一つである。

なお通常プラズマ重合においては、モノマーガスがアルゴンのバブリングによって供給されるが、HMDS を本発明に利用する場合には、バブリングを行わない場合に良好な疎水性膜の形成につながる。

本発明に基づいて固定化したポリヌクレオチドは、ストレプトアビジンとビオチンという、きわめて強固な結合によって固定されていることから、ハイブリダイズやガラススライドの洗浄といった操作を通じてガラススライドから遊離する心配がほとんど無い。特に洗浄工程においては、疎水性のプラズマ重合膜表面には水溶液が残らないことから、入念な洗浄を行わなくても反応液を完全に除去することができる。このことは、洗浄に伴う固定化ポリヌクレオチドの損失を最小限にするという意味からも、たいへん有利な特徴とすることができる。

- 22 -

本発明の固定化ポリヌクレオチドとして、ガラススライド表面に異なる塩基配列を持つ多種類のポリヌクレオチドを固定化した態様を示すことができる。このような固定化ポリヌクレオチドは、DNA アレイと呼ばれている。その中でも数千種～数万種におよぶ多量のポリヌクレオチドを高密度に配置したものが、DNA マイクロアレイである。本発明に基づいて DNA マイクロアレイを作成するには、固定化すべきポリヌクレオチドの合成にあたりビオチン修飾したプライマーを用いた PCR を行うと良い。たとえば、cDNA ライブラリーから単離されたクローンを鋳型として、ベクターの塩基配列からなるプライマーでインサートの増幅を行う。プライマーをビオチンで修飾しておけば、全ての増幅生成物はビオチンを有し、先に固定化してあるストレプトアビジンと結合させることができる。

また限られた面積に多種類のポリヌクレオチドをスポットするには、DNA アレイヤー(DNA arrayer)と呼ばれる自動化装置を用いることができる。DNA アレイヤーは、スポットすべき DNA を含む溶液を一定量分取し、スライドガラス上の定められた区域にスポットする作業を、自動的に、高速に行うための装置である。たとえば、ガラススライドやメンブレンフィルター上に、直径 100 $\mu\text{m}$  のスポットからなるドットを 10 $\mu\text{m}$  間隔で並べることができる DNA アレイヤー (GMS417、宝酒造) が市販されている。

本発明に基づく DNA マイクロアレイの作成に必要な、ストレプトアビジンを固定化したガラススライドは、ポリヌクレオチド固定化用の支持体として供給することができる。あるいは、更に固定化プローブの増幅に用いるビオチン化プライマーを組み合わせ、DNA マイクロアレイ作成用キットとすることもできる。本発明による DNA マイクロアレイ作成用キットには、たとえば cDNA ライブラリーから単離された cDNA クローンや、あるいは cDNA クローン単離用のベクターを添えることもできる。このようなキットを利用すれば、ユーザーは自身で作成したソースについて、cDNA ライブラリーの構築と、この cDNA ライブラリーに含まれる cDNA をプローブとする DNA アレイを容易に作成することができる。こうして作成



- 23 -

された DNA アレイは、様々な細胞における遺伝子発現プロファイルの作成に有用である。

本発明に基づく DNA マイクロアレイは、従来の DNA マイクロアレイと同様にハイブリダイゼーションアッセイに用いることができる。すなわち、蛍光標識した試料を接触させ、未反応成分を除いた後に、蛍光スポットを蛍光顕微鏡とスキャナーを利用して観察する。ところでガラススライドは蛍光を持たないことから、このような使い方に好適な支持体素材とされている。本発明ではプラズマ重合膜をガラス上にコートすることになるので、ガラスの蛍光特性を損なわないように自身が蛍光性を持たない素材を利用してプラズマ重合膜を形成するのが有利である。先に例示した HMDS は蛍光を発することが無いので、蛍光特性の点でもポリヌクレオチドの固定化に有利な素材である。

本発明は、ガラススライド上へのポリヌクレオチドの固定化のほか、酵素バイオセンサー上への酵素の固定化に利用することができる。すなわち、まず支持体側に、ガラススライドに代えて酸化還元電極の表面を利用する。固定化すべき第 2 の化合物としては、ビオチン修飾したポリヌクレオチドに代えて酵素をビオチン修飾して用いる。更に、酵素に代えて抗体を利用することにより、イムノセンサーを構成することもできる。酵素や抗体は、市販のビオチン化試薬によりビオチン化することができる。

本発明においては、抗体自身をリガンドとして固定化することも可能である。すなわち第 1 の物質として、プロテイン A やプロテイン G のような IgG 結合性タンパク質を用いる。次いで、それらのリガンドである IgG を結合させれば、IgG の固定化を達成することができる。このようにして固定化された IgG は、可変領域を液相側に向けた抗原との反応性に好適な状態とすることができる。

本発明において、プロテイン A のような IgG を結合するタンパク質を固定化した支持体は、IgG の精製、あるいは IgG が認識する抗原のイムノアフィニティクロマトグラフィーに有用である。その他、IgG が認識する抗原のイムノアッセイ

- 24 -

用固相抗体、並びにイムノセンサーとして利用することもできる。

更に、本発明の第1の物質として抗体、あるいはその抗原結合ドメインを含む断片を固定化することもできる。この態様においては、第1の物質として固定化された抗体、あるいはその抗原結合ドメインが、直接リガンドを結合する。本発明の第1の物質として IgG に代表される抗体を利用するときには、プラズマ重合膜の膜厚を 20～120 Å、好ましくは 30～90 Å、更に好ましくは 30～60 Å とすることにより、抗体の抗原に対する結合活性を高く維持することができる。抗体として抗原結合ドメインを含む断片を利用する場合には、固定化する断片の分子量に応じて膜厚を薄くすることにより、抗体活性の維持を期待することができる。本発明において固定化される抗体分子は、IgG に限定されず、リガンドを結合することができるあらゆるクラスの抗体分子に適用することができる。また、本発明において固定化される抗体分子は、リガンドとの結合活性を維持する限り、その断片、あるいはキメラ抗体や CDR グラフトによりよって得ることができる人工的な抗体分子であることもできる。

本発明において第1の物質として抗体を結合した固定化物質は、抗体が認識するリガンドの検出に用いることができる。すなわち、この固定化物質に検出すべきリガンドを含む試料を接触させ、抗体に結合するリガンドを検出することにより、リガンドの存在を検出することができる。

あるいは本発明によって、抗原を固定化することもできる。抗原には、タンパク質のみならず、糖鎖、脂質、あるいは各種の低分子有機化合物等の免疫応答を生じうるあらゆる化合物が含まれる。本発明によって固定化された抗原は、抗体の精製や抗体の検出を行うためのイムノセンサーとして有用である。

なお、本発明に基づいて抗体を固定化する場合には、プラズマ重合膜を親水性の素材で構成することによってタンパク質の非特異的な吸着を防止することができる。抗体のみならず、タンパク質は一般的には親水性表面に吸着しにくいものである。親水性のプラズマ重合膜を与えるモノマーガスとしては、アセトニトリ

- 25 -

ル、ビリジン、プロピルアミン、メチルアミン、あるいはトリエチルアミン等の窒素含有有機化合物等が用いられる。

本発明において、固定化すべき物質には、結合活性を持つタンパク質の他に、酵素のような触媒活性を持ったタンパク質を固定化することもできる。本発明によって固定化されたタンパク質は、プラズマ重合膜表面において触媒活性を維持している。そのため基質と接触しやすくなり、高度な酵素活性を示す。本発明によって固定化された酵素は、酵素バイオセンサ用の反応試薬として、あるいは各種バイオリアクターの触媒として有用である。本発明によれば、任意の形状の支持体に酵素を固定化できることから、微細な構造が求められるマイクロチップバイオセンサに用いることもできる。

一方、酵素を保持した限外ろ過膜表面をプラズマ重合膜でコートする公知の固定化方法では、酵素が膜の内部に封入されてしまうため、膜を通過した基質のみが酵素反応に与ることができる。そのため、酵素反応効率が膜の物理的な性状によって制限されてしまう。また、膜を通過できない大きな分子に対しては、酵素作用を発現することができない。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、実施例に用いたプラズマ重合装置の構成を示す図である。

図 2 は、本発明の固定化ポリヌクレオチドにおけるポリヌクレオチドの非特異的な吸着を、公知の方法で固定化したポリヌクレオチドと比較した結果を示す写真である。

図 3 は、実施例 2 において作成した、本発明によって抗体を固定化した支持体の構造を示す図である。

図 4 は、実施例 2 において作成した、本発明によって抗体を固定化した支持体

- 26 -

上の、抗体スポットの配置を示す図である。

図5は、本発明による抗体の固定化方法における、1層目のプラズマ重合膜の有無と、2層目のプラズマ重合膜の膜厚が与える影響を示すグラフである。縦軸が蛍光強度(Au)を、横軸が2層目のプラズマ重合膜の膜厚を示す。奥側 PPF60Åと示したのが1層目に膜厚60Åのプラズマ重合膜を施したときの結果を、また手前側のガラス基板と示したのが1層目のプラズマ重合膜無しで直接抗体を固定化したときの結果を示す。

図6は、実施例3において作成した、本発明によって抗体を固定化した支持体上の、抗体スポットの配置を示す図である。Anti-HSAと示した列には抗ヒト血清アルブミン抗体を、Anti-IgMと示した列には、抗IgM抗体をスポットした。

図7は、本発明によって固定化した抗体に対する、蛍光標識したIgMの反応性を比較した結果を示す図である。縦軸は、デバイスを蛍光標識したIgMに反応させる前の蛍光強度に対する反応後の蛍光強度の比を、横軸は2層目のプラズマ重合膜の膜厚を示す。奥側 Anti-IgMと示したのが抗IgM抗体に対する反応性を、また手前側の Anti-HSAと示したのが抗ヒト血清アルブミン抗体に対する反応性を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下に実施例に基づいて本発明を更に具体的に説明する。

〔実施例1〕本発明に基づいて、ガラス支持体上にストレプトアビジンを固定化し、更にビオチン修飾オリゴヌクレオチドを固定化した。

##### a) ガラスの洗浄

Dow Corning 社製 (7059) 0.7mm 厚のガラスを支持体として用いた。ガラスを、加熱した過酸化水素/アンモニア水/H<sub>2</sub>O (1:1:8) 内に 30 分間浸したのち、過剰量の H<sub>2</sub>O で繰り返し洗浄した。

##### b) ストレプトアビジンの固定化

- 27 -

プラズマ重合装置のサンプルステージ上に洗浄したガラスを配置し、ラジオ波の出力 150W、反応器内の真空度 0.3 Torr で薄膜形成を 1 分間行った。その後、0.5mg/ml のストレプトアビジン溶液（溶媒： $H_2O$ ）を特定の位置に 1  $\mu$ l ずつスポットし、4℃で乾燥させた。これをプラズマ重合装置のサンプルステージ上に再度配置し、上記と同様の条件で薄膜を形成した。ただし、プラズマ重合を行う時間は 30 秒とした。

#### c) オリゴ DNA の固定化

ビオチン化オリゴ DNA を溶解した溶液を、ストレプトアビジンを配置した位置に滴下し、ストレプトアビジン-ビオチン結合を介して固定化した（以後ここで用いたビオチン化オリゴ DNA をプローブ DNA と記載する）。10  $\mu$ M のプローブ DNA を、10mM Tris-HCl(pH7.0)、10mM EDTA、300mM NaCl からなる緩衝液に溶解してストレプトアビジン上に滴下し、1 時間室温で放置した。その後ガラスはリン酸緩衝液に浸した。

#### d) DNA ハイブリダイゼーション

5' 側を fluorescein 標識した DNA (200  $\mu$ M) を、10mM Tris-HCl(pH7.0)、10mM EDTA、300mM NaCl からなる緩衝液に溶解し、45℃で 1 時間 DNA ハイブリダイゼーションを行わせた。

#### e) 洗浄

プラズマ重合法を用いて作製されたアレーを、0.2×SSC 溶液中で 10 分間室温にて振とうし、洗浄した。ポリ-L-リシンコートしたアレーは、ハイブリダイゼーション後 1×SSC、0.3% SDS (sodium dodecyl sulfate) 溶液中で 5 分間の洗浄を行った後、0.2×SSC 溶液で 10 分間洗浄した。洗浄は振とう機を用いて室温で行った。結果を図 2 に示す。

公知の固定化 DNA では、洗浄前ではスポットを認めることができず、スポットの確認のためには十分な洗浄が必要であった。つまり、不十分な洗浄が非特異吸着につながる可能性が示された。一方本発明の固定化ポリヌクレオチドでは、ハ

- 28 -

イブリダイズの後にガラススライドを傾げるだけで、反応液をほぼ完全に除去することができ、洗浄を行わなくても明確に蛍光スポットの確認が可能であった。すなわち、本発明による固定化ポリヌクレオチドでは、ポリヌクレオチドの非特異吸着を生じにくいことが明らかである。

## 〔実施例 2〕

本実施例ではタンパク質を認識する素子として最も有用な抗体に着目し、これを固定化したチップを開発することを目的とする。まず、プラズマ重合法を用いた新しい抗体の固定化方法を検討した。

抗体の固定化に先立ち、まずガラス基板表面上にモノマーとして Hexamethyl disiloxane: HMDS を使用して、プラズマ重合により高分子薄膜を形成させた。次にその上に抗体をスポッティングによって配置し、さらにその上に HMDS プラズマ重合膜を形成させることにより、抗体を挟み込むようにして固定化した（図 3）。

プラズマ重合には図 1 のような装置を使用した。本実施例で使用した装置の特徴として、電極の位置とステージの位置を離れたということがあげられる。このことによって電磁波が生体試料に与える影響を軽減できると考えた。

つぎに、プラズマ重合法を用いて抗体を固定化する際の最適な条件を、抗原抗体反応が実際に行われるかどうかということによって検討した。デバイスのデザインは図 4 のようにガラス基板を 10 の区画にわけ、条件を変えて固定化した。

はじめにガラス基板を右半分と左半分の二つの領域に分け、左半分にのみ 60 Å のプラズマ重合膜(Plasma Polymerized film: PPF)を製膜した。製膜条件は、モノマーの流量が 18ccm、反応容器内の圧力を 25Pa(検出器：ピラニー真空計)になるように調節し、プラズマ重合反応開始後は反応容器内の圧力を 40Pa になるように保ち反応時間により膜厚を制御した。次いで、80 µg/ml の抗ヒト血清アルブミン IgG (ICN pharmaceuticals, Inc.) を、ピペットマンで各点 1 µl ずつスポットした。

- 29 -

4°Cにて一晩乾燥させた後、二層目のプラズマ重合膜を製膜した。その際、プラズマ重合膜の厚さが、図4にあるように0、30、60、120、および240 Åとなるように重合条件を調整した。

次いで作製したデバイスを蛍光標識したヒト血清アルブミン 120  $\mu$ g/ml (ICN pharmaceuticals, Inc.) を含む液中 1ml に室温で2時間浸漬し、蒸留水で15分洗浄した後蛍光強度を測定した。スポット各点でバックグラウンド補正した数値を平均し、グラフ化したものを示す(図5)。

奥側のグラフは、抗体のスポンティングの前に予め一層目のプラズマ重合膜を作成したときの結果、手前側のグラフはガラス基板上に抗体をスポットしたときの結果で、それぞれ2層目のプラズマ重合の膜厚による蛍光強度の変化を示している。

このグラフから一層目のプラズマ重合膜が存在し、二層目のプラズマ重合膜の膜厚が30～60 Åのときに蛍光強度が最も高くなることがわかった。一層目のプラズマ重合膜が存在する方が高い蛍光強度をえられることは、HMDS をモノマーとするプラズマ重合膜が疎水性になることから、抗体の疎水性部分との結合能が高くなるためだと考えられる。

また、二層目のプラズマ重合膜の膜厚が30～60 Åのときに蛍光強度が高くなることは、抗体の大きさが約90 Åであると推測されるので、結合サイトが残っているためだと考えられる。また、プラズマ重合膜が形成される際に下から結晶成長すると考えられているので、結合サイトを残したまま抗体を固定化することができると考えられる。

### 〔実施例3〕

次に、本発明によって固定化した抗体で特異的に抗原抗体反応を検出することができることを確認した。試薬として、抗ヒト血清アルブミン IgG(ICN pharmaceuticals, Inc.) 抗ヒト IgM IgG (CORTEX BIOCHEM, INC.)、そして蛍光標識した IgM (CORTEX BIOCHEM, INC.) を用いた。

- 30 -

用いたデバイスは、図6のようにデザインした。すなわち、まず一層目に膜厚 60 Å のプラズマ重合膜を製膜した上に、基板の左半分には抗ヒト血清アルブミン IgG (Anti-HSA) 80  $\mu$ g/ml、右半分には抗ヒト IgM IgG (Anti-IgM) 80  $\mu$ g/ml をそれぞれ 1  $\mu$ l づつスポットした。4°C にて一晩乾燥させた後、二層目のプラズマ重合膜を成膜した。その際、プラズマ重合膜の厚さが、実施例2と同様に 0、30、60、120、および 240 Å となるように重合条件を調整した。

次いで作製したデバイスを蛍光標識した IgM 100  $\mu$ g/ml を含む溶液 1ml に一晩浸した後、蒸留水で 15 分洗浄し、蛍光強度を測定した。

測定結果を図7に示す。

このグラフにおいて縦軸は、デバイスを蛍光標識した IgM に反応させる前の蛍光強度に対して、反応後に何倍の蛍光強度が得られたかということを示している。奥側の棒グラフは抗ヒト IgM IgG (Anti-IgM) を、手前側の棒グラフは抗ヒト血清アルブミン IgG (Anti-HSA) をスポットした点における蛍光強度の、二層目のプラズマ重合の膜厚による変化を表している。

手前側のグラフからわかるように、Anti-HSA のスポットでは蛍光強度の変化が観察されないのに対して、Anti-IgM をスポットした場合には、膜厚に応じて蛍光強度が変化している。この結果は、先の実験で明らかにした膜厚による抗体の免疫学的な反応性の変化が、蛍光強度の変化として表れたことを示している。このグラフから、固定化した抗体が抗原と特異的に反応することがわかった。また、IgM と Anti-IgM の反応において、二層目のプラズマ重合膜の膜厚を 30 ~ 60 Å としたときに最も蛍光強度が高いことがわかった。この結果は、抗体の大きさが約 90 Å 程度であると推測されるので、抗体の結合サイトを残したまま基板に固定化されているためであると考えられる。

本実施例により、プラズマ重合法を用いてガラス基板上に抗体を有効な結合サイトを残したまま固定化することが可能であることがわかった。また、二層目のプラズマ重合膜の膜厚を変えたときに得られる蛍光強度が変化したことから、抗体の大



- 31 -

きさと二層目のプラズマ重合膜の膜厚に何らかの関係があることが示唆された。さらに、抗体と疎水性の表面との疎水？疎水インタラクションにより、一層目のプラズマ重合膜が有利に働くことがわかった。本発明によって作成された抗体を固体化した支持体は、リガンドである抗原の特異的な検出に有用である。

#### 産業上の利用の可能性

本発明によって、固定化すべき物質に与えるダメージが小さく、しかも固定化後に物質が遊離することのない、固定化物を得ることができる。本発明によって得られた固定化物質は、プラズマ重合膜表面に固定化物が持つ結合活性などを維持している。したがって、たとえばストレプトアビジンのような結合活性物質を固定化物質とすれば、そのリガンドであるビオチンを利用して更に他の物質を間接的に固定化することができる。この原理をポリヌクレオチドに利用すれば、ビオチン化ポリヌクレオチドを固相上の任意の位置に、高密度に容易に固定化することが可能となる。この特徴は、DNA マイクロアレイの製造に有用である。

加えて、プラズマ重合膜によって表面を覆われた固定化物質には、プラズマ重合膜を構成するモノマーガスの選択によって任意の表面特性を付与することができる。たとえば、疎水性のプラズマ重合膜を形成することによって、ポリヌクレオチドが吸着しにくい表面特性を与えることができる。このような固定化物質は、ポリヌクレオチドの特異的な結合に基づくシグナルの検出を可能とし、バックグラウンドノイズの低い高感度な検出系を実現する。

あるいは本発明は、タンパク質を支持体表面に固定化するための技術として有用である。本発明によれば、タンパク質を容易に、かつ確実に支持体表面に固定することができる。しかも本発明によれば、固定化反応に伴うタンパク質に対するダメージが小さく、しかも固定化後も高い活性を維持することができる。この特徴は、抗体やタンパク質ライブラリーの固定化に有用である。これらこれらのタンパク質を固定化した支持体は、プロテオーム解析の重要なツールとなる。

- 32 -

請求の範囲

1. 次の工程を含む支持体表面に物質を固定化する方法。
  - a) 支持体表面に固定化すべき第1の物質を配置する工程
  - b) 工程a)の後に支持体表面にプラズマ重合膜を形成する工程
2. 第1の物質がタンパク質である請求項1に記載の方法。
3. タンパク質が結合活性を持つものである請求項2に記載の方法。
4. タンパク質が、アビジン、ストレプトアビジン、レクチン、プロテインA、プロテインG、抗体、レセプター、およびDNA結合性タンパク質、またはそれらの誘導体からなる群から選択されたいずれかのタンパク質である請求項3に記載の方法。
5. 結合活性を有するタンパク質が抗体、またはその抗原結合ドメインを含む断片である請求項4に記載の方法。
6. プラズマ重合膜の膜厚が30～120 Åである請求項5に記載の方法。
7. 工程b)の後に、結合活性を持つタンパク質に、そのリガンドで修飾した第2の物質を結合させる工程c)を含む請求項3に記載の方法。
8. 第2の物質が、タンパク質、糖、ポリヌクレオチド、ホルモン、および生理活性物質からなる群から選択されるいずれかの物質である請求項7に記載の方法。
9. 第2の物質がポリヌクレオチドである請求項8に記載の方法。
10. 第1の物質がアビジンおよび／またはストレプトアビジンであり、かつ第2の物質を修飾するリガンドがビオチンである請求項9に記載の方法。
11. 異なる塩基配列を持つポリヌクレオチドを支持体上の定められた区画ごとに結合させる請求項9に記載の方法。
12. プラズマ重合膜が疎水性表面を持つものである請求項9に記載の方法。
13. 工程a)における支持体表面に予めプラズマ重合膜が形成されている請求

- 33 -

項 1 に記載の方法。

14. 予め形成されたプラズマ重合膜が疎水性表面を有している請求項 13 に記載の方法。

15. タンパク質が酵素活性を持つものである請求項 2 に記載の方法。

16. 請求項 1 の方法によって得られる固定化物質。

17. 請求項 5 の方法によって得られる固定化物質。

18. 請求項 9 の方法によって得られる固定化物質。

19. 以下の要素で構成される固定化物質。

a) 支持体表面に配置された第 1 の物質、

b) 第 1 の物質を保持するプラズマ重合膜

20. 第 1 の物質がタンパク質である請求項 19 に記載の固定化物質。

21. タンパク質が結合活性を持つものである請求項 20 に記載の固定化物質。

22. タンパク質が、アビジン、ストレプトアビジン、レクチン、プロテイン A、プロテイン G、および DNA 結合性タンパク質、またはそれらの誘導体からなる群から選択されたいずれか 1 つのタンパク質である請求項 21 に記載の固定化物質。

23. タンパク質が抗体である請求項 22 に記載の固定化物質。

24. プラズマ重合膜の膜厚が 30 – 120 Å である請求項 23 に記載の固定化物質。

25. 結合活性を持つタンパク質に、そのリガンドで修飾した第 2 の物質が結合されている請求項 21 に記載の固定化物質。

26. タンパク質が酵素活性を持つものである請求項 20 に記載の固定化物質。

27. 以下の要素で構成される固定化ポリヌクレオチド。

a) 支持体表面に配置された結合性のタンパク質

b) 結合性のタンパク質を保持するプラズマ重合膜

c) 結合性のタンパク質のリガンドを介して支持体表面に固定化されたポリ

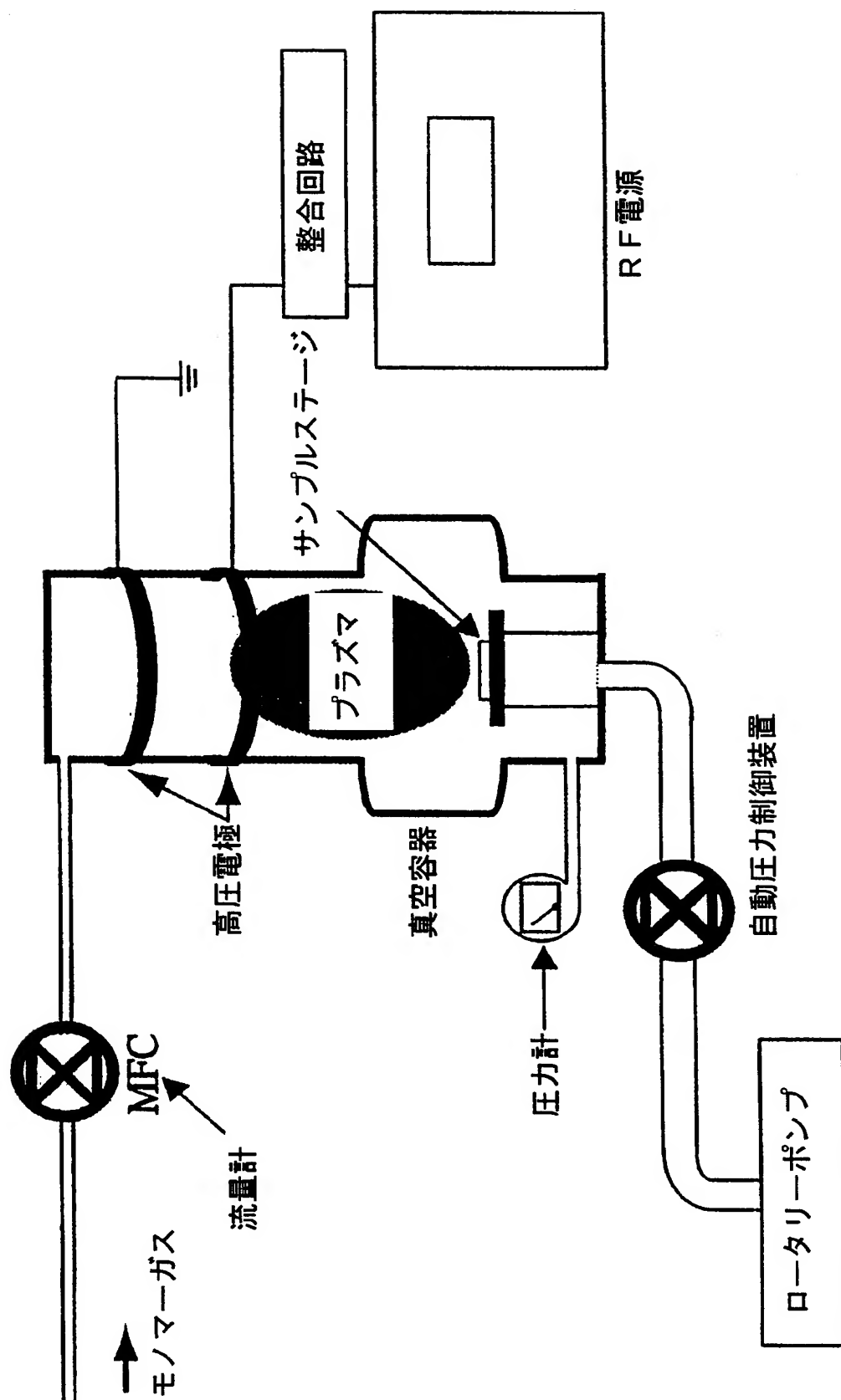
- 34 -

ヌクレオチド

28. 異なる塩基配列を持つポリヌクレオチドが支持体上の定められた区画ごとに結合された請求項27に記載の固定化ポリヌクレオチド。
29. 支持体表面に結合性のタンパク質をプラズマ重合膜で保持させたポリヌクレオチド固定化用担体。
30. 請求項29に記載の担体と、結合性のタンパク質に対するリガンドで修飾したプライマーとを含む、ポリヌクレオチド固定化用キット。
31. 次の工程を含む核酸ハイブリダイゼーションアッセイ法。
  - a) 請求項18に記載の固定化物質、または請求項27に記載の固定化ポリヌクレオチドに検出すべき核酸を含む試料を接触させる工程
  - b) プローブと試料中の核酸とのハイブリダイゼーションを検出する工程
32. 次の工程を含むリガンドの検出方法。
  - a) 請求項17、または請求項23に記載の固定化物質に、検出すべきリガンドを含む試料を接触させる工程
  - b) 抗体またはその抗原結合ドメインを含む断片と試料中のリガンドとの結合を検出する工程

1 / 7

図 1

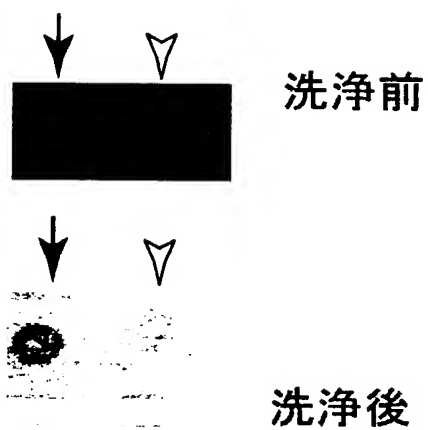


2/7

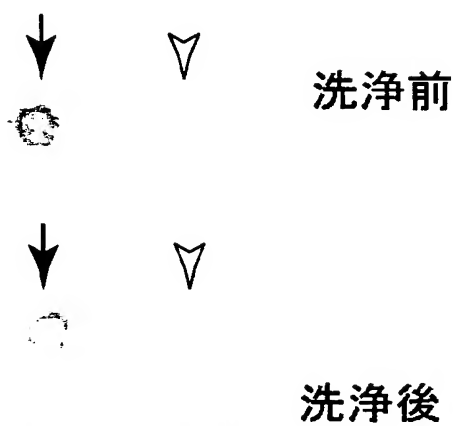
図 2

**A**

ポリ-L-リジン コート アレイ

**B**

プラズマ重合膜コートアレイ



3 / 7

図 3

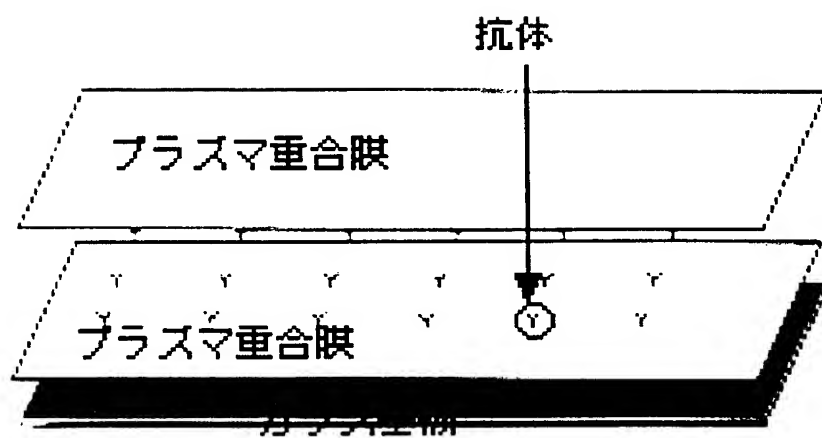


図 4

		一層目 P P F 60 Å	一層目 ガラス基板
2層目 P P F 240 Å		○○○○ ○○○○	○○○○ ○○○○
	120 Å	○○○○ ○○○○	○○○○ ○○○○
	60 Å	○○○○ ○○○○	○○○○ ○○○○
	30 Å	○○○○ ○○○○	○○○○ ○○○○
	0 Å	○○○○ ○○○○	○○○○ ○○○○



図 5

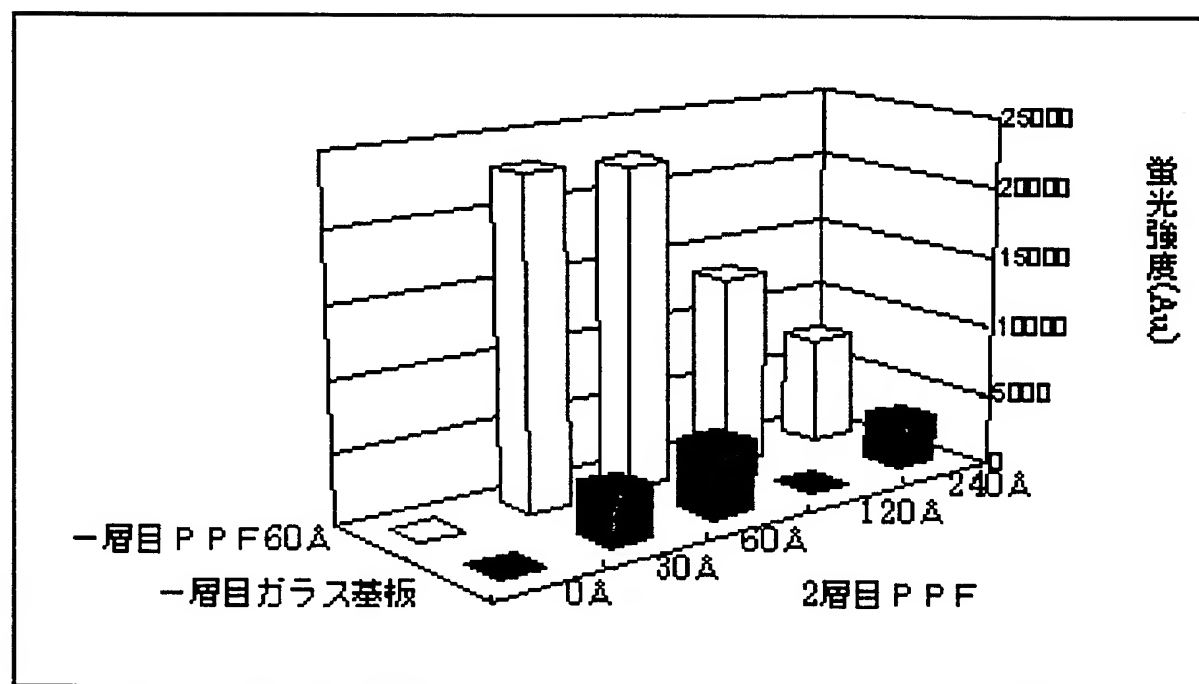
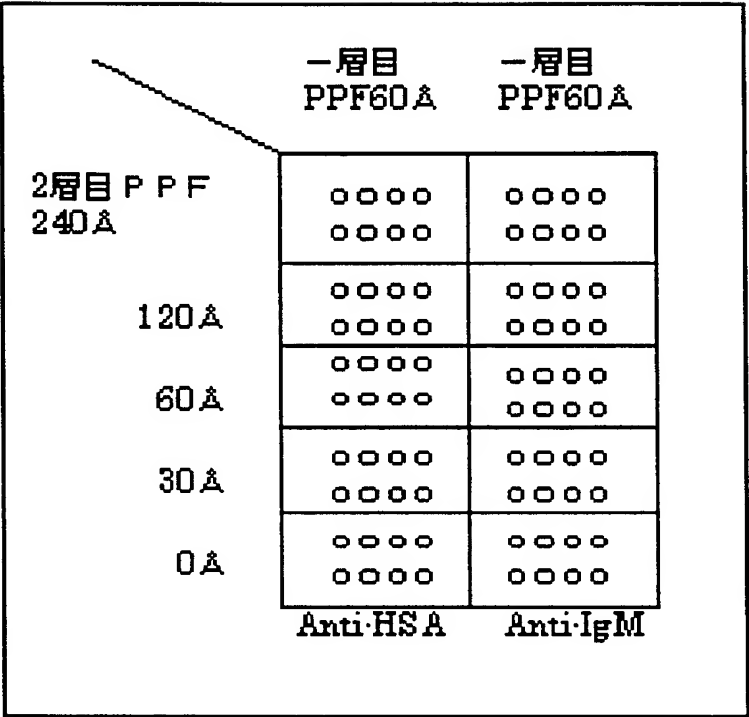
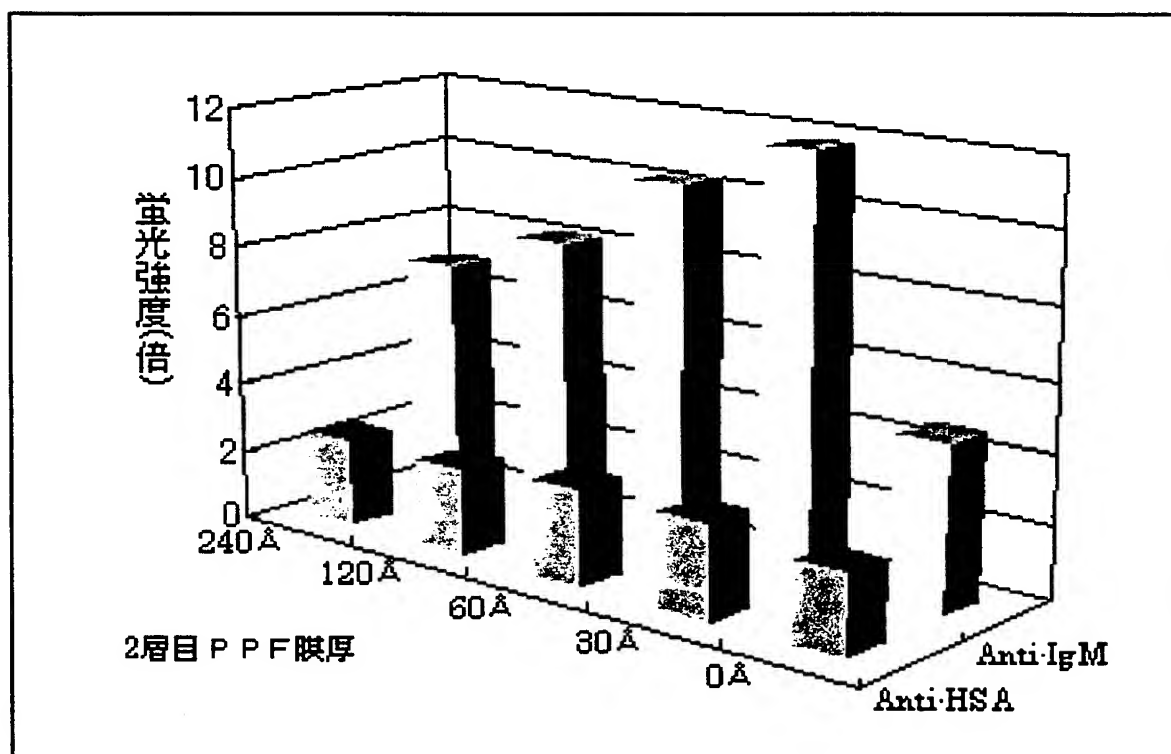


図 6



7 / 7

図 7



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07736

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/543, G01N33/547

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/543, G01N33/547

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2001  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2001 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2001

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP, 57-197034, A (Agency of Industrial Science and Technology), 03 December, 1982 (03.12.82), Claims; page 2, lower right column; page 5, upper right column (Family: none)	1, 16 2-15, 17-32
X Y	JP, 2-131500, A (Industrial Technology Research Institute), 21 May, 1990 (21.05.90), Claims; page 2, upper right column & EP, 351950, A & US, 5028657, A	1-3, 15, 16, 19, 20 4-14, 17, 18, 21-32
Y	JP, 2000-39401, A (Dainippon Printing Co., Ltd.), 08 February, 2000 (08.02.00), Claims (Family: none)	2-15, 17-32
A	JP, 10-114832, A (Boehringer Mannheim GmbH), 06 May, 1998 (06.05.98) & EP, 806250, A & US, 5932296, A & DE, 19618926, A	1-32

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 12 January, 2001 (12.01.01)	Date of mailing of the international search report 23 January, 2001 (23.01.01)
--	---

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>7</sup> G01N33/543, G01N33/547

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>7</sup> G01N33/543, G01N33/547

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2001年
日本国登録実用新案公報	1994-2001年
日本国実用新案登録公報	1996-2001年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 57-197034, A (工業技術院長) 3. 12月. 1982 (03. 12. 82) 特許	1, 16
Y	請求の範囲、第2ページ右下欄、第5ページ右上欄 (ファミリーなし)	2-15, 17-32
X	JP, 2-131500, A (インダストリアル テクノロジー リサーチ イ ンスチテュート) 21. 5月. 1990 (21. 05. 90) 特許請求の範囲、第2	1-3, 15, 1
Y	ページ右上欄 &EP, 351950, A &US, 5028657, A	6, 19, 20
Y	JP, 2000-39401, A (大日本印刷株式会社) 8. 2月. 2000 (08. 02. 00)	4-14, 17, 1
A	特許請求の範囲 (ファミリーなし)	8, 21-32
	JP, 10-114832, A (ヘーリンカー マンハイム ゲーエム&ハー) 6. 5月. 1998 (0	2-15, 17-32
	6. 05. 98) &EP, 806250, A &US, 5932296, A &DE, 19618926, A	1-32

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

・日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日  
12. 01. 01

国際調査報告の発送日  
23.01.01

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
加々美一恵

2J 9408

電話番号 03-3581-1101 内線 3252